

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11

Veröffentlichungsnummer:

**0 338 395
A2**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21

Anmeldenummer: 89106463.6

51

Int. Cl. 4: **C12P 21/00 , C12N 15/00 ,
C12N 5/00 , A61K 39/104 ,
G01N 33/577**

22

Anmeldetag: 12.04.89

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:
ES + GR

30

Priorität: 19.04.88 DE 3813023

43

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
25.10.89 Patentblatt 89/43

84

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71

Anmelder: **BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
D-3550 Marburg 1(DE)**

72

Erfinder: **Domdey, Horst, Dr.
Fasanenweg 6
D-8027 Neuried(DE)
Erfinder: Marget, Matthias
Olgastrasse 12
D-8000 München 19(DE)
Erfinder: von Specht, Bernd-Ulrich, Prof. Dr.
Am Waldweg
D-8193 Ambach(DE)**

74

Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.
et al
HOECHST Aktiengesellschaft Postfach 3540
D-6121 Wiesbaden(DE)**

54

Monoklonaler Antikörper gegen *Pseudomonas aeruginosa*, seine Herstellung und Verwendung.

57

Ein monoklonaler Antikörper (mAK) wird beschrieben, der mit allen bisher bekannten 19 *Pseudomonas aeruginosa*-Serotypen kreuzreagiert. Die Sequenz der variablen Regionen ist angegeben. Dieser mAK kann als Diagnostikum, als Wirkstoff oder als Wirkstoffträger eingesetzt werden.

EP 0 338 395 A2

Monoklonaler Antikörper gegen *Pseudomonas aeruginosa*, seine Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper (mAK), der mit allen bisher bekannten 19 *Pseudomonas aeruginosa*-Serotypen kreuzreagiert. Dieser Antikörper kann als Diagnostikum, als Wirkstoff oder als Wirkstoffträger eingesetzt werden.

Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistisches, gramnegatives, pathogenes Bakterium. Es kann lebensbedrohliche Krankheiten verursachen, z. B. Pneumonie bei Patienten mit zystischer Fibrose oder Septikämie bei Patienten mit Brandverletzungen bzw. Knochen- oder Harnwegsinfektionen. Die Therapie von durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachten Erkrankungen mittels Antibiotika ist durch sein Resistenzmuster schwierig und oft erfolglos. Deshalb richtete sich die Aufmerksamkeit bei der Infektionsbekämpfung auf Immunprophylaxe und Immuntherapie. Schutz gegen alle 19 Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* ergab eine Mischung von gereinigten äußeren Membranproteinen (OMP) F, H2 und I (von Specht et al. (1987) Infection 15, 408 - 412). Bei der o.g. Untersuchung wurden aus immunisierten Mäusen Lymphozyten isoliert und in bekannter Weise mit NS-1 Myelomzellen (Kearny et al. (1979), J. Immunology, 123, 4, 1548 - 1550) fusioniert. Aus etwa 500 erhaltenen Hybridomen wurde ein mAK - im folgenden mAK 6A4 bezeichnet - ausgewählt, der die nachfolgend aufgezählten vorteilhaften Eigenschaften besitzt:

- starke und einheitliche Reaktion mit allen 19 *Pseudomonas aeruginosa* Serotypen
- positiver C1g Bindungstest
- schützend bei Belastungsinfektion von Mäusen mit *Pseudomonas aeruginosa*.

Zusätzlich wurde die cDNA bestimmt (siehe Beispiele, Tab. 1 und Tab. 2). Ein humaner mAK kann nun erhalten werden, indem die konstanten Genbereiche des Mausantikörpers durch die entsprechenden humanen Sequenzen ersetzt werden. Die Expression dieser "humanisierten" Antikörpersequenz in eukaryotischen Zellen, zum Beispiel CHO-Zellen oder Hefen, liefert den entsprechenden humanen mAK, der für diagnostische Zwecke, für Prophylaxe und Therapie eingesetzt werden kann.

Die Erfindung betrifft folglich

- a) gereinigte und isolierte DNA-Sequenzen, die für mAK 6A4 kodieren oder Teile davon, einschließlich ihrer Transkriptionsprodukte, sowie die entsprechende Kombination der "humanisierten" Sequenzen,
- b) diese Sequenzen ganz oder teilweise enthaltende DNA-Strukturen und Vektoren,
- c) mit solcher DNA transformierte pro- oder eukaryotische Zellen,
- d) die von diesen Zellen aufgrund der Transformation exprimierten Polypeptide oder Teile davon,
- e) deren Aminosäuresequenzen,
- f) Diagnostika, Prophylaktika oder Therapeutika, die Peptide oder Aminosäuresequenzen von (e) alleine oder in Kombination enthalten,
- g) ein Verfahren zur gentechnischen Herstellung der unter (d) genannten Polypeptide oder Teilen davon,
- h) sowie das Epitop, an das Antikörper kodiert von Sequenzen unter (a) binden.

Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den nachfolgenden Beispielen, Tabellen und den Patentansprüchen aufgeführt.

Beispiel 1: Herstellung des mAK 6A4

1a) Reinigung der zur Immunisierung zu verwendenden äußeren Membranproteine OMP F, H2 und I von *Pseudomonas aeruginosa* Serotyp 12

OMP F, H2 und I wurden wie von T. Mizuno und M. Kageyama in J. Biochem. 84, 179-258 (1978) beschrieben aus *Pseudomonas aeruginosa* Serotyp 12 gereinigt. Demgemäß wurden die Zellen in der späten Log-Phase geerntet, durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen und die Zellmembranen durch einstündige Zentrifugation bei 100 000 g gesammelt. Die Zellmembranen wurden schrittweise mit 2% SDS, 10% Glycerin und 2% SDS und schließlich 0.1 M NaCl extrahiert. Die übriggebliebene unlösliche Fraktion enthält hauptsächlich OMP F, OMP H2 und etwas OMP I.

1b) Immunisierung von Balb/c Mäusen mit OMP F, H2 und I

Zur Immunisierung erhielt jede Maus 50 µg gereinigte OMP's (80 µl) in einer Suspension mit 20 µg Al-(OH)₃ i.p. an Tag 1, was mit derselben Dosis an Tag 14 und Tag 21 wiederholt wurde. Nach weiteren 4 Wochen wurde nochmals geboostert (gleiche Dosis) und nach anschließend 3 Tagen die Milzen entnommen.

5

1c) Zellfusion

Bei der Zellfusion wurde im wesentlichen nach der Methode von G. Köhler und C. Milstein, Eur. J. Immunol. 6, 511 - 519 (1976) vorgegangen. Etwa 1×10^8 Milzzellen präpariert aus den entnommenen Milzen von (1b) wurden mit 5×10^7 NS-1 Myelomzellen (Kearny et al., a.a.O., kommerziell erhältlich von der American Type Culture Collection über ATCC Nr. TIB 18) in 2ml 50% Polyethylenglycol 1500 (Serva, Heidelberg) fusioniert. Nach der Fusion wurden die Zellen mit 1×10^6 /ml normalen Milzzellen in Dulbeccos modifiziertem Minimalmedium (MEM) ausplattiert, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) enthält. Antikörper-Produktion wurde durch den nachfolgend beschriebenen Enzyme-linked-immuno-sorbent Assay (ELISA) geprüft und Klone von Interesse wurden durch Ausverdünnen gewonnen.

20

1d) ELISA zum Nachweis von Antikörper-sezernierenden Klonen

Mit Hilfe eines direkten ELISA'S wurde bestimmt, ob und in welchem Umfang die verschiedenen mAK an das Antigen binden.

Mikrotiterplatten der Firma Dynatech, Plochingen, aus Polyvinylchlorid, mit 96 Vertiefungen, wurden mit 100µl *Pseudomonas aeruginosa* Sonikat (s.u., 1 : 200 verdünnt mit PBS = 4,5µg/ml) des Serotyps 12 beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal ge waschen und 1 Stunde bei 37°C mit in PBS verdünntem bovinem Serumalbumin abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurden die Vertiefungen mit Folie abgedeckt und die Platten bis zur Verwendung bei minus 20°C aufbewahrt.

Für jeden zu testenden Klon wurden (von einer logarithmischen Verdünnungsreihe 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16,...) jeweils 50µl Ascites (als Doppelproben) einpipettiert.

Als positive Kontrolle diente polyklonales Mausserum von mit den Membranproteinen aktiv immunisierten und 4-fach geboosterten Mäusen (1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000). Als negatives Kontrollserum wurde das Serum nicht immunisierter Mäuse verwendet.

Als Verdünnungsmedium diente PBS (phosphate buffered saline). Nach einstündiger Inkubation der Platte bei 37°C und dreimaligem Waschen wurden 50µl Peroxydase konjugiertes Anti-Maus-F(ab)₂ in der Verdünnung 1 : 500 zugegeben.

Nach erneuter einstündiger Inkubation bei 37°C und dreimaligem Waschen wurden 50µl des Substrats o-Phenylendiamin (0,2% OPD, 0,015 % H₂O₂) zugegeben. Alle ELISA-Reagenzien stammten aus dem NEI-501 Kit der Fa. NEN New England Nuclear, Dreieich.

Nach weiterem dreißigminütigem Inkubieren wurde die Reaktion mit 50µl 4,5M H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450nm mit einem ELISA-Auswertgerät MR 580 der Firma Dynatech bestimmt. Positive Klone zeigten eine Extinktion $\geq 0,2$ OD.

Aus 7 Klonen der engeren Wahl wurde der Klon, der mAK 6A4 sekretiert, für die anschließenden Untersuchungen ausgewählt, weil mAK 6A4 die auf S. 2 geschilderten Vorteile besitzt und zusätzlich stark sekretiert wird (etwa 1% der gamma-Globulin-Fraktion in Ascites-Flüssigkeit besteht aus mAK 6A4). mAK 6A4 gehört zur IgG2a Klasse und reagiert mit OMP I.

Sonikatherstellung:

50

Die Bakterien des Serotyps 0-12 wurden in Trypticase-Soy-Bouillon angezüchtet. Dann wurden sie 3x gewaschen und in Natrium-Chlorid-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 3 x 5 Minuten (mit je 2 Minuten Abstand) beschallt.

Nach erneutem Zentrifugieren (1x mit 5000 U/Min./10 Minuten) wurde der Überstand portioniert und bis zur Verwendung bei minus 20°C gelagert. Die Proteinkonzentration betrug bei den beschichteten Platten 4,5µg / Vertiefung.

Beispiel 2: Isolierung und Sequenzierung der für die variablen Bereiche kodierenden cDNA von mAK 6A4

2a) cDNA Isolierung

5 6A4-Hybridomzellen wurden aus Ascites-Flüssigkeit durch Zentrifugation (10 Min. bei 1500 g und 4° C) abgetrennt. Daraus wurde nach H. Domdey et al., Cell 39, 611-621 (1984) die Poly (A)⁺ RNA gewonnen. cDNA wurde ausgehend von 15 µg Poly (A)⁺ RNA mit einem kommerziell erhältlichen cDNA-Synthese Kit (Fa. Amersham) synthetisiert. Die doppelsträngige, glattendige cDNA wurde mittels des von Fa. NEN New
10 England Nuclear erhältlichen Klonierungs Kits mit einzelsträngigen Oligo-dC-Enden versehen und mit entsprechend Oligo-dG-endigem Plasmid pBR322 annelliert. Nach Transformation (Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol. 166, 557-580) von kompetenten E.coli K12 Stamm JM 109 Zellen (Yanisch - Perron C. et al., (1985) Gene 33, 103-119) wurden etwa 12 000 Transformanten erhalten, die mit ³²P-endmarkiertem Oligonukleotid 5'-CAGGCATCCTAGAGTCAC-3' (I) zum Nachweis von Klonen, die cDNA der schweren
15 Kette von Subgruppe II B enthalten, hybridisiert wurden. Ebenso wurde das mit ³²P-Deoxynukleotidtriphosphaten "nicktranslatierte" 2 850 Basenpaare (bp) große Hind III-Bam HI Fragment (II) des Plasmids C1 (W.O. Weischert et al., (1982) Nucleic Acids Res. 10, 3627-3645) zur Hybridisierung verwendet. (I) stammt aus der Region des IgG2a^a-Allels in der Maus (Schwere Kette). (II) kodiert für die Kappa- konstante Region (Leichte Kette). Die Hybridisierungen wurden wie bei D. Woods, Focus 6, 1-2 (1984) beschrieben
20 durchgeführt. Etwa 4.2% bzw. 1.6% der Kolonien reagierten positiv mit den kappa- bzw. gamma-spezifischen Sonden.

2b) cDNA-Sequenzierung

25 Aus den oben gewonnenen Plasmid-enthaltenden Kolonien wurden solche ausgesucht, die vermutlich komplette cDNA'S der leichten bzw. schweren Kette enthielten. Die Insert-DNA der Plasmide pUL5 (enthaltend die cDNA der leichten Kette) und p BH7 (enthaltend die cDNA der schweren Kette) wurden nach Standardmethode sequenziert (F. Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci USA 74, 5463-5467),
30 modifiziert wie beschrieben durch E.Y. Chen und P. Seeburg, DNA 4, 165-170 (1985). Die Nukleotidsequenzen der jeweiligen variablen Regionen sind in Tab. 1 (leichte Kette) und Tab. 2 (schwere Kette) angegeben. Für die konstanten Regionen sind die jeweiligen Nukleotidsequenzen - nicht mehr in den Tabellen angegeben - identisch mit den aus der Literatur bekannten (gamma-Kette: Schreier et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 4495--4499; Kappa-Kette: P.H. Hamlyn et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9, 4485-4494).
35 Die Gesamtlänge der kodierenden Regionen beträgt für die leichte Kette 717 bp und für die schwere Kette 1407 bp, wobei die ersten 20 Aminosäuren der leichten Kette das "Leader-Peptid" darstellen, so daß die reife leichte Kette 259 Aminosäuren lang ist. Die schwere Kette besitzt ein "Leader-Peptid" von 19 Aminosäuren, demzufolge das reife Molekül 450 Aminosäuren lang ist.

40

45

50

55

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

-96	CTGcaggggggggggACAGGCAGGTGGGGACAGATGGATTACACAGGCCCGGTTCTT	-60
	MetAspSerGlnAlaGlnValLeu	-20
-36	ATATTGCTGCTGCTATGGGTATCTGGTACGTGTGGGGACATTTGTGTGTACACAGTCTCCA	
-12	IleLeuLeuLeuLeuTrpValSerGlyThrCysGlyAspIleValMetSerGlnSerPro	1
96	TCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAGGTCACATATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGT	
9	SerSerLeuAlaValSerAlaGlyGluIysValThrMetSerCysLysSerSerGlnSer	
156	CTGCTCAACAGTATAACCCGGAAGAACTTCTTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAG	
29	LeuLeuAsnSerIleThrArgLysAsnPheLeuAlaIleTyr ¹ GlnGlnLysProGlyGln	
216	TCTCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTC	
49	SerProLysLeuLeuIleTyrTrpAlaSerThrArgGluSerGlyValProAspArgPhe	
276	ACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCACAGCAGTGTGCAGGCTGAAAGAC	
69	ThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerValGlnAlaGluAsp	
336	CTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATTAATCTTCGGACGTTTCGGTGGAGGCCACCAAG	
09	LeuAlaValTyrTyrCysLysGlnSerTyrAsnLeuArgThrPheGlyGlyGlyThrLys	
396	CTGGAAATCAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATGCACTGAG	
109	LeuGluIleLysArgAlaAspAlaAlaProThrValSerIlePheProProSerSerGlu	113

Tab. 2

-120	ctgcagggggggaataacgntcagcatccctctccacnagcacactgaaaanactctgacctc
-60	ACAA ⁻⁵⁷ TGGAAAGGCACCTGGNTCTTTCTTCCCTGTTTTTCAGTTACTGCGAGGTGTCCACTCC
-19	MetGluArgHisTrpIlePheLeuPheSerValThrAlaGlyValHisSer ⁻¹³
1	CAGGTCACGCTTCAGCAGCTCTGGGGCTGNACTGGCAAAACCCTGGGGCCTCAGTGGAAGNTG
1	GlnValGlnLeuGlnSerGlyAlaGlnLeuAlaLysProGlyAlaSerValLysMet
61	TCCTGCCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGCCTACTGGATGCACCTGGGTAAACACAGAGG
21	SerCysLysAlaSerGlyTyrrThrpheThrAlaTyrrTrpMetHisTrpValLysGlnArg
121	CCTGGACAGGGCTCTGGNATGGATTGGATACATTAACTCTAACACCTGGTTATACTGAATAC
41	ProGlyGlnGlyLeuGlutrrPilleGlyTyrrIleasnProAsnThrGlyTyrrThrGluTyrr
181	AATCAGAARCTTCAGGACAAGGCCACATTTGACTGCAGACAAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
61	AsnGlnaspPheLysaspLysAlaThrLeuThrAlaaspLysSerSerSerThrAlaTyrr
241	ATGCNACTGAGCAGCCTGCATCTGAGGACTCTGCGTCTATATATTGTRCANGAAGCTAC
81	MetGlnLeuSerSerLeuThrSerGluaspSerAlaValTyrrCysThrArgSertyr
301	TATAACTACGAGGGGGCTNTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
101	TyrAsnTyrrGluGlyAlaMetaspTyrrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSer
361	GCCAAAAACACAGCCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTGGAGATACAACTGGG
121	AlaLysThrThrAlaProSerValTyrrProLeuAlaproValCysGlyaspThrThrGly

Ansprüche

1. DNA-Sequenzen, kodierend für die variablen Antikörper-Regionen oder Teile davon gemäß Tabelle 1 und Tabelle 2.
2. Monoklonale Antikörper (mAK), dadurch gekennzeichnet, daß die variablen Regionen die Aminosäuresequenzen von Tab. 1 und Tab. 2 oder Teile davon enthalten, einschließlich der Allele und Mutanten, soweit diese Allele und Mutanten Reaktivität mit OMP I von *Pseudomonas aeruginosa* besitzen.
3. mAK nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die konstanten Regionen oder Teile davon murinen Ursprungs sind und bevorzugt IgG2a entsprechen.
4. mAK nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die konstanten Regionen oder Teile davon humanen Ursprungs sind.

5. Hybridome, die mAK nach Anspruch 2 oder 3 sezernieren.
6. Expressionssysteme die mAK nach Anspruch 4 exprimieren.
7. Epitop, dadurch gekennzeichnet, daß monoklonale Antikörper nach Anspruch 2, 3 oder 4 binden.
8. Verfahren zur Herstellung von Hybridomen nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein
- 5 Säugetier mit Äußeren Membranproteinen (OMP) von *Pseudomonas aeruginosa* immunisiert wird, Milzzellen aus einem solchen Tier entnommen, mit Myelomzellen, vorzugsweise NS-1-Zellen fusioniert und die resultierenden Hybridome auf Sezernierung von mAK gegen OMP von *Pseudomonas aeruginosa* selektio-
- niert werden.
9. Verfahren zur Herstellung von mAK nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß
- 10 die für die variablen Regionen kodierenden DNA-Sequenzen oder Teile davon mit für die konstanten Regionen kodierenden Antikörpersequenzen oder Teilen davon verknüpft und in einem Expressionssystem exprimiert werden.
10. Verfahren zur Herstellung von mAK nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die für die variablen Regionen nach Anspruch 1 kodierenden DNA-Sequenzen oder Teile davon mit den für die
- 15 konstanten humanen Regionen kodierenden Antikörpersequenzen oder Teilen davon verknüpft und in einem Expressionssystem exprimiert werden.
11. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 2, 3 oder 4 als Arzneimittel.
12. Verwendung von mAK nach Anspruch 2, 3 oder 4 in einem Diagnostikum.
13. Verwendung von mAK nach Anspruch 2, 3 oder 4 als Träger für eine pharmazeutischen Wirkstoff.

20

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) dadurch gekennzeichnet, daß die für die
- 25 variablen Antikörper-Regionen oder Teile davon gemäß Tabelle 1 und 2 kodierenden DNA-Sequenzen in ein geeignetes Antikörper-Gerüst integriert und in geeigneten Expressionssystemen exprimiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die konstanten Regionen oder Teile davon murinen Ursprungs sind.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die konstanten Regionen oder Teile davon
- 30 humanen Ursprungs sind.
4. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 1, 2 oder 3 erzeugte mAK eingesetzt werden.
5. Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln, dadurch gekennzeichnet, daß pharmazeutische Wirkstof-
- fe an einen nach Anspruch 1, 2 oder 3 hergestelltem mAK gebunden werden.
- 35 6. Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 1, 2 oder 3 hergestellte mAK mit pharmakologisch üblichen Zusätzen gemischt werden.

40

45

50

55